



Title	ウシミトコンドリアDNAの混在がマウス個体発生間の遺伝子発現に及ぼす影響 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	小松, 雅也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14817号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85466
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Komatsu_Masaya_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称： 博士(農学)

氏名 小松 雅也

学位論文題名

ウシミトコンドリア DNA の混在がマウス個体発生間の遺伝子発現に及ぼす影響

背景と目的

ミトコンドリアは、細胞におけるエネルギー分子 ATP の産生やアポトーシスの誘導など、生物に必須の機能を多数有する細胞小器官である。ミトコンドリアに内在するミトコンドリア DNA (mtDNA) 配列の種特異性の維持は、種を維持していく上で必要不可欠であると予想される。しかし、異種 mtDNA 混在による個体への影響は不明であり、異種 mtDNA の遺伝を阻止する機構は全く分かっていない。これまで、マウス胚にウシミトコンドリアを混在させた mtB-M 胚を用いた当研究室の過去の研究により、哺乳類では異種 mtDNA が混在した場合、胎盤形成不全によって子孫への伝達を阻止することが判明した。この知見は、胎盤細胞にしか寄与しない 4 倍体胚と mtB-M 胚を凝集させた胚 (Xenon 胚) からウシ mtDNA を保持したマウスである Xenon の誕生したことにより決定付けられた。本研究では、Xenon 作出系を用いて異種 mtDNA が個体に伝達された際の胎子系列細胞および胎盤形成への影響について遺伝子発現調節の観点から明らかにすることで mtDNA の種特異性維持機構についての理解を深めることを目的とした。

(1) ウシミトコンドリア混在マウス新生子由来肺組織における網羅的遺伝子発現

Xenon の新生子では、出生直後に自発呼吸ができず死亡する個体が頻発したことから、主要な呼吸器である肺の機能異常が疑われた。そこで、Xenon の肺について網羅的遺伝子発現解析を実施し、体外受精胚由来のマウス肺 (IVF 肺) と比較した。その結果、Xenon 肺ではウシ mtDNA からの転写が行われていないこと、および、遺伝子発現パターンが IVF 肺と異なることが明らかになった。また、Xenon 肺における低発現遺伝子群にはミトコンドリアに関する遺伝子が多数存在しており、高発現遺伝子群には広範な遺伝子発現制御を行う miRNA が含まれていた。加えて、肺形成関連遺伝子の有意な発現変動もみられた。

(2) ウシミトコンドリア混在マウス新生子肺におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体関連遺伝子および miRNA の遺伝子発現

網羅的遺伝子発現解析より得られた遺伝子発現変化の結果を裏付けるために、定量 PCR によって遺伝子の発現量を決定することを目的とした。Xenon 肺における低発現遺伝子群の中で、ミトコンドリアの主要な働きの一つである ATP 合成を行う呼吸鎖複合体のサブユニット遺伝子に着目した。加えて、高発現遺伝子群については miRNA に着目した。Xenon 肺では 12 種の呼吸鎖複合体 I-V サブユニット遺伝子の発現量の有意な低下がみられた ($P < 0.05$)。また、miR-19a、miR-27b、および miR-143 の有意な発現増加がみられた ($P < 0.05$)。以上より、呼吸鎖複合体の活性低下および miRNA 群発現変動によるグローバルな遺伝子発現変動への影響が推察された。

(3) ウシミトコンドリア DNA 混在がマウス肺株化細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

Xenon 肺で検出された呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子群と miRNA の発現異常の原因がウシ mtDNA の混在にあることを決定すべく、核 DNA を持たず mtDNA のみを持つウシ血小板とマウス肺由来培養細胞 LLC を融合させたサイブリッド細胞を作製し、遺伝子発現解析を行った。サイブリッド細胞においても、Xenon 肺と同様の呼吸鎖複合体サブユニット遺伝子群の発現低下と miRNA の発現増加が再現された。本結果より、ウシ mtDNA の混在がマウス細胞における呼吸鎖複合体遺伝子群および miRNA 群の遺伝子発現変動を引き起こすことが強く裏付けられた。

(4) ウシミトコンドリア DNA 混在がマウス肺細胞における miRNA の転写調節領域の DNA メチル化修飾に与える影響

遺伝子発現調節領域の CpG アイランドにおけるメチル化修飾は、遺伝子発現を負に制御する。メチル化修飾の変化はミトコンドリア機能の異常に起因することから、Xenon 肺およびサイブリッド細胞において発現増加した miRNA の DNA メチル化修飾状態を解析した。その結果、いずれも複数の miRNA の CpG アイランドが有意に低メチル化状態となっており ($P < 0.05$)、ウシ mtDNA の混在によりメチル化修飾状態の変化が引き起こされることが示された。

(5) ウシミトコンドリア DNA の混在がマウス胎盤系列の表現型および遺伝子発現に及ぼす影響

これまでの研究で Xenon 胚由来胎盤の妊娠満期 (E19.5) の重量が IVF 胚由来胎盤に比較して増加することが確認されていたが、胎盤形成におけるウシ mtDNA 混在の影響は不明であった。そこで、まず Xenon 胎盤の妊娠中期 (E9.5) におけるウシ mtDNA の動態を検証し、妊娠満期で得られた胎盤の組織学的解析を実施した。最後に、体細胞クローンマウスの知見から胎盤肥大化に関与するとされる遺伝子の発現レベルと DNA メチル化修飾状態を調べた。その結果、これまで E19.5 の Xenon 胎盤からウシ mtDNA は未検出であったが、E9.5 では胚体外組織から検出された。また、E19.5 Xenon 胎盤では、胎盤を構成する海綿栄養芽層の有意な肥大化がみられ ($P < 0.05$)、海綿栄養芽層肥大化の原因遺伝子とされる *Sfmbt2* の発現量が有意に増加していた ($P < 0.05$)。体細胞クローンマウス胎盤でもエピジェネティックな遺伝子発現制御の破綻が *Sfmbt2* 発現異常の原因であることから、Xenon 胎盤も同様の機序で胎盤肥大化が起きたと推察された。体細胞クローンマウス胎盤でもエピジェネティック制御破綻の原因は明らかにされていないが、本研究結果とあわせて考えるとミトコンドリアの機能異常に起因しているのかもしれない。

結論

これまで、異種 mtDNA の混在が個体発生および遺伝子発現に及ぼす影響は不明であった。本研究により、マウス胎子系列の肺細胞ではウシ mtDNA の混在により DNA メチル化状態が変化し、それに伴い発現増加した miRNA の影響も相まって、網羅的な遺伝子発現パターンの変化が起こったことから、異種 mtDNA の混在は胎子系列の細胞にも影響を及ぼすことが初めて示された。Xenon においては、肺の機能異常が出生直後の自発呼吸不全につながったことが示唆された。また本研究で判明した次世代への異種 mtDNA の伝達による胎子系列への致死的影響を未然に防ぐために、胎盤形成不全によって異種 mtDNA の遺伝を防いでいるものと推察された。ゲノムとは、その生物を規定する全遺伝情報であるが、mtDNA もまたその種の特異性を規定する一翼を担い、異種 mtDNA 混在により mtDNA の種特異性が脅かされることを防止する機構が哺乳類細胞に備わっていることが示唆された。さらに本研究結果は、mtDNA と核 DNA の協調関係が個体発生の成否を定めていることを示すものであり、発生生物学および遺伝学において極めて重要な知見を与えるものである。mtDNA 変異による様々な疾患の分子的機序の詳細には不明点が多い。本研究をさらに進め、mtDNA と核 DNA の協調制御機構の解明が進めば mtDNA 変異で引き起こされる疾患の病因解明および治療法開発に貢献できるかもしれない。